

适用于分析细胞内蛋白质组分研究的两向电泳法

刘 蓉

(中国科学院生物物理研究所)

哺乳动物体细胞内含有上万种不同蛋白质,各组分在细胞内的丰度因组织和细胞类型而异,也会在转化、分化和激素反应过程中发生变化。每个细胞内各种蛋白质含量的大致范围是 10^3 — 10^9 个分子。到目前为止细胞内所含蛋白质已被仔细研究过的还不足1000种,多数属于可以直接测定其活性的代谢酶,至于那些在结构方面或调节过程中起作用的蛋白质则由于确切功能了解不多,测定尚有困难。

1975年以来,O'Farrell^[1,2]及其同事先后用等电聚焦(IEF, pH4—7)和非平衡pH梯度电泳(NEPHGE, pH7—10)作为第一向电泳;再用SDS凝胶电泳作第二向,在两向凝胶电泳法中成功的分离了细胞内上千种不同蛋白质的组分,初步开辟了利用两向电泳图谱法、根据不同蛋白质组分的电荷和分子量的区别分离细胞内蛋白质并进行分析的途径。1980年11月J. J. Garrell^[3]在O'Farrell等工作的基础上报道了借助于计算机分析蛋白质两向凝胶电泳的方法,指出细胞匀浆或亚细胞分部,在严格控制的操作条件下,进行两向凝胶电泳,可以从1000个培养细胞制成的匀浆中,分离出1000个以上的多肽斑点,斑点位置可以重复,每个斑点上蛋白质含量相当于样品内蛋白质总量的百万分之一亦可测定。鉴于从细胞匀浆分离得到的蛋白质斑点很多,而且不同来源细胞蛋白组分也各不相同,建立两向电泳图谱的计算机分析体系和数据库是可取的。然而,建立计算机分析体系也面临着一定困难,首先是分离所得的某些组分可能是起源于蛋白质在分析过程中由于化学修饰如脱酰胺作用或巯基的氧化作用等而产生的人为产物;其次是为了保证电泳图谱中各组分位置可以重复以便进行比较,除了需要建立

特殊的计算机软件体系加以鉴别以外,还必需建立切实可行的相对定量方法和标准坐标体系。为了解决蛋白质在两向电泳图谱中的定位问题,Garrell建议用提纯的肌酸激酶及其一系列氨甲酰化的衍生物作为第一向IEF电泳中带不同电荷组分定位的参考标准,因为肌酸激酶及其氨甲酰修饰物之间的电荷差别恰好是整数单位;在第二向SDS电泳中则可采用大鼠心脏匀浆作参考标准,因为大鼠心脏组织的主要蛋白质组分的分子量为已知,可以用它们来标定第二向分离以后所得斑点的分子量。

1981年,Celis和Bravo^[4,5]对Garrell的方法又作了一些技术上的改进。首先改进了细胞培养和标记技术,用高比活 $[^{35}\text{S}]$ Met标记单层培养的哺乳类细胞,可把每个细胞内掺入的 $[^{35}\text{S}]$ 活性从1000cpm提高到6000—8000cpm,这样就大大提高了方法的灵敏度。目前在两向凝胶电泳中一次实验的样品载量可达400,000cpm,相当于50~100个培养细胞的总放射性。另外就是把第一向凝胶电泳分别在两种pH范围进行,在pH4.5—7.5用等电聚焦电泳分离酸性蛋白组分,pH7.5—10.5用非平衡pH梯度电泳分离碱性蛋白组分,(在碱性区域可用NEPHGE蛋白9作为蛋白定位的参考标准)然后再在第二向进行SDS电泳。这样从100个用 $([^{35}\text{S}]\text{Met})$ 标记24小时的Hela细胞,两向电泳得到的凝胶,曝光10小时得到的图谱中,分离出1169个多肽斑点,其中855个为酸性蛋白,314个为碱性蛋白。斑点清晰,位置可以重复。假如延长凝胶在放射自显影时的曝光时间,甚至有可能分析单个小鼠内瘤180(Sarcoma 180)细胞的多肽图谱。最近试用 $([^{14}\text{C}]\text{Sev})$,或 $([^{14}\text{C}]\text{Ala})$ 标

(下转第47页)

表 2 乙基氯汞与氯代甲基氯汞浸泡效应比较

	比重(克/厘米 ³)	重原子位置	占有率(电子数)	$\frac{\sum \Delta F }{\sum F_P }$
乙基氯基-胰岛素	1.279	Hg _I	45.9	0.36
		Hg _{II}	30.1	
氯代甲基氯基-胰岛素	1.321	Hg _I	69.2	0.69
		Hg _{II}	47.9	
		Hg _{III}	57.0	
		Hg _{IV}	45.6	

注: 1. 此处所引参数均系 2.5 Å 分辨率的修正结果;
2. $\sum|\Delta F|/\sum|F_P|$ 系取 2.5 Å 分辨率 hko 型 171 个衍射点统计结果, F_P 表示母体结构振幅。 $\Delta F = F_{HP} - F_P$, 其中 F_{HP} 表示衍生物结构振幅。

当然,试剂中有机基团的作用是多方面的,不能单用碳-汞键的诱导效应来解释一个试剂的浸泡行为。

伍伯牧、窦士奇同志曾协助部分衍射实验,谨此致谢。

(上接第 62 页)

记 Hela 细胞,可以得到一些 [³⁵S]Met 标记所发现不了的斑点,可见利用不同标记方法进行细胞内蛋白组分的研究仍有潜力可挖。

从目前已有的资料来看,体细胞内蛋白质两向凝胶电泳图谱的测定,所提供的信息是多方面的:首先是可以测定组织中蛋白质的种类、数量,并可对它们进行定位和定量。其次是利用 [³⁵S]Met 及其它放射性标记法如 [¹⁴C]Sev、 [¹⁴C]Ala 等,可测定不同组分的磷酸化和糖苷化情况,以及这些变化的半衰期;除此以外还可以跟踪体细胞在转化、分化、或激素反应过程

参 考 文 献

[1] Matthews, B. W.: *The Proteins*, New York, Academic Press, 3nd. ed., 2, 476, 1976.
[2] *International Table For X-Ray Crystallography*, 2nd. ed., Kynoch Press, 3, 1968.
[3] Blundall, T. L. et al.: *Protein Crystallography*, Academic Press, 182, 1976.
[4] 北京胰岛素结构组:《中国科学》1974 年第 6 期,第 591 页。
[5] Canty, A. J. et al.: *J. Chem. Soc. Dalton*, 2018, 1976.
[6] Hiroaki, S. et al.: *J. Organometal. Chem.*, 120, 161, 1976.
[7] Taylor, N. J. et al.: *J. Chem. Soc. Dalton*, 438, 1975.
[8] Wyckoff, R. W. G.: *Crystal Structure*, 2nd. ed., Interscience Publishers, 1, 135, 1963.
[9] Dickerson, R. E. et al.: *J. Mol. Biol.*, 45, 77, 1969.
[10] Blake, C. C. F.: *Advances in Prot. Chem.*, Academic Press, 23, 59, 1968.
[11] Watson, H. C. et al.: *J. Mol. Biol.*, 8, 166, 1964.
[12] 蒋明谦等,《化学学报》1962 年第 28 期,第 275 页。

[本文于 1980 年 3 月 18 日收到]

中,细胞内蛋白质组分的变化,从而为探讨转化、分化和激素反应中,各蛋白质组分在体细胞基因表达和调控中所起的作用提供信息。

参 考 文 献

[1] O'Farrell, P. H.: *J. Biol. Chem.*, 250, 4007, 1975.
[2] O'Farrell, P. Z. et al.: *Cell*, 12, 1133, 1977.
[3] Garrells, J. I.: *Trends Biochem. Sci.*, 5, 281, 1980.
[4] Celis, J. E. et al.: *Trends Biochem. Sci.*, 6, 197, 1981.
[5] Bravo, R. et al.: *Cell Biol. Int'l. Rep.*, 5, 93, 1981.